

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003年9月25日 (25.09.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/078635 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/54, 9/10, 1/21, C12J 1/04

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/02946

(22) 国際出願日: 2003年3月12日 (12.03.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-072931 2002年3月15日 (15.03.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ミツカングループ本社 (MITSUKAN GROUP CORPORATION) [JP/JP]; 〒475-8585 愛知県 半田市 中村町2丁目6番地 Aichi (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 後藤 英嗣 (GOTO, Hidetsugu) [JP/JP]; 〒475-0836 愛知県 半田市 青山1-7-3 Aichi (JP). 中野 繁 (NAKANO, Shigeru) [JP/JP]; 〒470-2212 愛知県 知多郡 阿久比町卯坂字坂部2-8 Aichi (JP).

(74) 代理人: 戸田 親男 (TODA, Chikao); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1-19-14 邦楽ビル503 戸田特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GENE PARTICIPATING IN ACETIC ACID TOLERANCE, ACETIC ACID BACTERIUM BRED USING THE GENE, AND PROCESS FOR PRODUCING VINEGAR WITH THE USE OF THE ACETIC ACID BACTERIUM

(54) 発明の名称: 酢酸耐性に関与する遺伝子、該遺伝子を用いて育種された酢酸菌、及び該酢酸菌を用いた食酢の製造方法

(57) Abstract: It is intended to provide a novel gene participating in the acetic acid tolerance of an acetic acid bacterium; a method of improving the acetic acid tolerance of a microorganism, in particular, an acetic acid bacterium using the gene; and a process for efficiently producing vinegar having an elevated acetic acid concentration with the use of the acetic acid bacterium having the thus improved acetic acid tolerance. A gene enabling an acetic acid bacterium to grow in a medium at such an acetic acid concentration that it cannot grow in usual is obtained from an acetic acid bacterium chromosomal DNA library. Thus, a novel gene having a function of improving the acetic acid tolerance of a practically available acetic acid bacterium belonging to the genus *Gluconacetobacter* to a practically usable level is cloned. In a transformant having the above gene transferred into an acetic acid bacterium, the acetic acid tolerance is remarkably improved. When this transformant is cultured under aeration in the presence of ethanol, the growth inductive period can be shortened and the growth speed can be elevated. Moreover, the final acetic acid concentration can be remarkably elevated thereby.

(57) 要約: 本発明は、酢酸菌の酢酸耐性に関与する新規な遺伝子を提供すること、及び該遺伝子を用いて微生物、特に酢酸菌の酢酸耐性を向上させる方法、さらに酢酸耐性が向上した酢酸菌を用いて、より高酢酸濃度の食酢を効率良く製造する方法を提供する。本発明においては、酢酸菌の染色体DNAライブラリーから、通常は増殖できない酢酸濃度の培地でも増殖を可能にさせる遺伝子を取得する方法により、グルコンアセトバクテラ属に属する実用酢酸菌から酢酸耐性を実用レベルで向上させる機能を有する新規な遺伝子をクローニングした。また、該遺伝子を酢酸菌に導入した形質転換株においては、顕著に酢酸耐性が向上し、エタノール存在下で該形質転換株を通気培養した場合に、増殖誘導期を短縮させ、増殖速度も向上させることができ、さらに最終到達酢酸濃度を顕著に向上させることを可能とした。

WO 03/078635 A1

## 明 細 書

酢酸耐性に関与する遺伝子、該遺伝子を用いて育種された酢酸菌、  
及び該酢酸菌を用いた食酢の製造方法

## 発明の属する技術分野

本発明は、微生物に由来する酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードする遺伝子、これのコピー数を増幅した微生物、特にアセトバクター属 (Acetobacter) 及びグルコンアセトバクター属 (Gluconacetobacter) に属する酢酸菌、及びこれらの微生物を用いて高濃度の酢酸を含有する食酢を効率良く製造する方法に関する。

## 従来技術

酢酸菌は食酢製造に広く利用されている微生物であり、特にアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属に属する酢酸菌が工業的な酢酸発酵に利用されている。

酢酸発酵では、培地中のエタノールが酢酸菌によって酸化されて酢酸に変換され、その結果、酢酸が培地中に蓄積することになるが、酢酸は酢酸菌にとっても阻害的であり、酢酸の蓄積量が増大して培地中の酢酸濃度が高くなるにつれて酢酸菌の増殖能力や発酵能力は次第に低下する。

そのため、酢酸発酵においては、より高い酢酸濃度でも増殖能力や発酵能力が低下しないこと、すなわち酢酸耐性の強い酢酸菌を開発することが求められており、その一手段として、酢酸耐性に関与する遺伝子（酢酸耐性遺伝子）をクローニングし、その酢酸耐性遺伝子を用いて酢酸菌を育種、改良することが試みられている。

これまでの酢酸菌の酢酸耐性遺伝子に関する知見としては、アセトバクター属の酢酸菌の酢酸耐性を変異させて酢酸感受性にした株を元の耐性に回復させ

ることのできる相補遺伝子として、クラスターを形成する3つの遺伝子（*a a r A*、*a a r B*、*a a r C*）がクローニングされていた（例えば、非特許文献1参照）。

この内、*a a r A*遺伝子はクエン酸合成酵素をコードする遺伝子であり、又、*a a r C*遺伝子は酢酸の資化に関係する酵素をコードする遺伝子であると推定されたが、*a a r B*遺伝子については機能が不明であった（例えば、非特許文献2参照）。

これらの3つの酢酸耐性遺伝子を含む遺伝子断片をマルチコピープラスミドにクローニングし、アセトバクター・アセチ・サブスペシーズ・ザイリナム I F O 3 2 8 8 (*Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* IF03288) 株に形質転換して得られた形質転換株は、酢酸耐性の向上レベルが僅かであり、また実際の酢酸発酵での能力の向上の有無については不明であった（例えば、特許文献1参照）。

一方、酢酸菌からクローニングされた膜結合型アルデヒド脱水素酵素（*A L D H*）をコードする遺伝子を酢酸菌に導入することによって、酢酸発酵において最終到達酢酸濃度の向上が認められた例が開示されている（例えば、特許文献2参照）。しかし、*A L D H*はアルデヒドを酸化する機能を有する酵素であって酢酸耐性に直接関係する酵素ではないことから、*A L D H*をコードする遺伝子が真に酢酸耐性遺伝子であるとは断定できないものであった。

特許文献1

特開平3-219878号公報

特許文献2

特開平2-2364号公報

特許文献3

特開昭60-9489号公報

特許文献4

特開昭60-9488号公報

## 非特許文献 1

「ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (Journal of Bacteriology)」、172 巻、2096-2104, 1990 年」

## 非特許文献 2

「ジャーナル・オブ・ファーメンテーション・アンド・バイオエンジニアリング (Journal of Fermentation and Bioengineering)、76 巻、270-275, 1993 年」

## 非特許文献 3

「アプライド・オブ・エンバイロメト・アンド・マイクロバイオロジー (Applied of Environment and Microbiology) 55 巻、171-176, 1989 年」

## 非特許文献 4

「アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry), 52 巻, p. 3125-3129, 1988 年」

## 非特許文献 5

「アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry), 49 巻, p.2091-2097, 1985 年」

## 非特許文献 6

「バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー (Bioscience, Biotechnology and Biochemistry), 58 巻, p.974-975, 1994 年」

## 発明が解決しようとする課題

以上のように、従来より酢酸菌の酢酸耐性を遺伝子レベルで解明し、高い酢酸耐性を有する実用酢酸菌の開発に成功した例は報告されていない。しかし、酢酸耐性にすぐれた酢酸菌が開発されれば、従来より高濃度の酢酸発酵が行われ、高濃度酢酸、高濃度食酢の効率的製造が可能となることから、本発明者らは、再度、酢酸菌の酢酸耐性の向上を遺伝子レベルで解明することとした。

そして本発明者らは、各方面から検討した結果、酢酸耐性を実用レベルで向上させうる機能を有するタンパク質をコードする新規な酢酸耐性遺伝子を取得し、また取得した酢酸耐性遺伝子を用いて、より強い酢酸耐性を有する酢酸菌を育種することが重要であるとの観点にたち、酢酸菌に属する微生物由来の酢酸耐性に関与する新規な遺伝子を提供すること、及び該遺伝子を用いて微生物の酢酸耐性を向上させる方法、特に酢酸菌に属する微生物の酢酸耐性を向上させる方法、さらに酢酸耐性が向上した酢酸菌を用いて、より高酢酸濃度の食酢を効率良く製造する方法を提供することを新規技術課題として新たに設定した。

#### 課題を解決するための手段

本発明者らは、酢酸存在下でも増殖し、発酵することができる酢酸菌には、他の微生物には存在しない特異的な酢酸耐性に関与する遺伝子が存在するとの仮説を立て、こうした遺伝子を用いれば、従来以上に微生物の酢酸耐性を向上させることができ、さらには高濃度の酢酸を含有する従来得ることができなかった新規食酢の効率的な製造法を開発することが可能になるとの新規着想を得た。

従来の酢酸耐性遺伝子の取得方法は、酢酸菌の酢酸感受性の変異株を相補する遺伝子をクローニングする方法などが一般的であった。

しかし、このような方法では産業上有用な酢酸耐性遺伝子を見出すことは困難であると考え、鋭意検討した結果、本発明者らは、酢酸菌から酢酸耐性遺伝子を見出す方法として、酢酸菌の染色体DNAライブラリーを構築し、この染色体DNAライブラリーを酢酸菌に形質転換し、通常1%程度の酢酸の存在下でしか生育できない株を、2%の酢酸の存在下でも生育可能にする遺伝子をスクリーニングすることによって取得する方法を開発した。

この方法によって、実際に食酢製造に用いられているグルコンアセトバクテリヤ属の酢酸菌から、酢酸耐性を実用レベルで向上させる機能を有する新規な酢酸耐性遺伝子をクローニングすることにはじめて成功した。

## 図面の簡単な説明

## 図 1

Pst I を用いてクローニングされたグルコンアセトバクター・エンタニイ由来の遺伝子断片 (pP1) の制限酵素地図と酢酸耐性遺伝子の位置、及び pSPT への挿入断片の概略図。

## 図 2

inverse PCR 法を用いてクローニングされたアセトバクター・アセチ由来の遺伝子断片 (pP2) の制限酵素地図と酢酸耐性遺伝子の位置、及び pSPT2 への挿入断片の概略図。

## 図 3

グルコンアセトバクター・エンタニイ由来酢酸耐性遺伝子のコピー数を増幅した形質転換株の培養経過を示す図面。

## 図 4

グルコンアセトバクター・エンタニイ由来酢酸耐性遺伝子のコピー数を増幅した形質転換株の温度変化と酢酸発酵経過を示す図面。

## 図 5

グルコンアセトバクター・エンタニイ由来酢酸耐性遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 2) を示す。

## 図 6

アセトバクター・アセチ由来酢酸耐性遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 4) を示す。

## 図 7

プライマー 1 を示す。

## 図 8

プライマー 2 を示す。

## 図 9

プライマー 3 を示す。

## 図 10

プライマー 4 を示す。

図 1 1

プライマー 5 を示す。

図 1 2

プライマー 6 を示す。

得られた酢酸耐性遺伝子は、DDBJ/EMBL/Genbank及びSWISS-PROT/PIRにおいてホモロジー検索した結果、スフィンゴモナスなどで見出されているスフィンゴ脂質合成の第一段階を触媒するセリンパルミトイルトランスフェラーゼ (serine palmitoyltransferase) と称されるタンパク質と相同性を示しており、酢酸菌のセリンパルミトイルトランスフェラーゼをコードする遺伝子であると推定された。

しかし、これまでに原核生物からセリンパルミトイルトランスフェラーゼの遺伝子が取得されたのは前記のスフィンゴモナス属の例のみである。

さらに、取得された酢酸菌のセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子は、スフィンゴモナス属で見出されている既知のセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子とはアミノ酸配列レベルで46.3%の、またマウスのそれとは25%前後の相同性であり、その相同性の程度は極めて低いものであったことから、他のセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子とある程度は似ているものの、酢酸菌に特異的な新規タンパク質 (タンパク質SPTということもある) をコードする新規遺伝子であることが確認された。

また、該遺伝子をプラスミドベクターに連結して酢酸菌に形質転換し、コピー数を増幅させた形質転換株においては、顕著に酢酸耐性が向上し、その結果、エタノール存在下で該形質転換株を通気培養した場合に、増殖誘導期が短縮する上に、増殖速度、生酸速度が向上すると共に、さらに最終到達酢酸濃度が顕著に向上することなどを見出し、更に該タンパク質のアミノ酸配列、及びそれをコードする遺伝子DNAの塩基配列の決定にも成功し、本発明を完成するに

至った。

すなわち本発明の実施態様は下記のとおりである。

(1) 下記の (A)、又は (B) に示すタンパク質 S P T。

(A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質。

(2) 下記の (A)、又は (B) に示すタンパク質 S P T をコードする遺伝子の D N A。

(A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質。

(3) 下記の (a)、又は (b) に示す D N A である請求項 2 に記載の遺伝子の D N A。

(a) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 1 8 7 ~ 1 3 8 6 からなる塩基配列を含む D N A。

(b) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 1 8 7 ~ 1 3 8 6 からなる塩基配列又はその一部を有するプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードする D N A。

(4) 下記の (A)、又は (B) に示すタンパク質 S P T 2。

(A) 配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質 S P T 2。

(5) 下記の (A)、又は (B) に示すタンパク質 S P T 2 をコードする遺伝子の D N A。



(A) 配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質 S P T 2。

(6) 下記の (A)、又は (B) に示す DNA である (5) に記載の遺伝子の DNA。

(A) 配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 1 1 0 ~ 1 3 2 1 からなる塩基配列を含む DNA。

(B) 配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 1 1 0 ~ 1 3 2 1 からなる塩基配列又はその一部から作製したプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、増殖速度を促進する機能を有するタンパク質をコードする DNA。

(7) 上記 (2)、又は (3)、もしくは (5)、又は (6) に記載の DNA の細胞内のコピー数が増幅されたことにより、酢酸耐性が増強された微生物。

(8) 微生物がアセトバクター属、又はグルコンアセトバクター属の酢酸菌であることを特徴とする上記 (7) に記載の微生物。

(9) 上記 (7)、又は (8) に記載の微生物のうち、アルコール酸化能を有するものを、アルコールを含有する培地で培養して該培地中に酢酸を生成蓄積せしめることを特徴とする食酢の製造方法。及び、それによって得られた酢酸含量が高い (1 0 ~ 1 7 . 5 %) 新規な食酢。

(1 0) 上記 (2)、又は (3) に記載の DNA を含んだ組換えプラスミド p U S P T ( F E R M B P - 7 9 3 2 )、もしくは上記 (5)、又は上記 (6) に記載の DNA を含んだ組換えプラスミド p U S P T 2 ( F E R M B P - 8 3 0 4 )。

(1 1) 少なくとも配列表の配列番号 1 又は配列番号 3 に示す塩基配列を有する DNA 断片を含んでなる組換えプラスミドであって、例えば、酢酸菌一大腸菌シャトルベクター (マルチコピーベクター) p M V 2 4 にこれらの DNA 断片を挿入してなるプラスミド p S P T、又はプラスミド p S P T 2、及び/又

は、このプラスミド p S P T や p S P T 2 をアセトバクター・アセチ (*Acetobacter aceti*) No. 1023 (FERM BP-2287)、又はアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株 (FERM BP-491) に導入してなる形質転換体。

本発明によれば、微生物に対して、酢酸に対する耐性を付与し、増強することができる。そして、アルコール酸化能を有する微生物、特に酢酸菌においては、酢酸に対する耐性が顕著に向上し、培地中に高濃度の酢酸を効率良く蓄積する能力を付与することができる。

#### 発明の実施の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

##### (1) 本発明のDNA

本発明のDNAは、スフィンゴモナス属のセリンパルミトイルトランスフェラーゼとある程度の相同性を有し、且つ酢酸耐性を向上させる機能を有する配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードし得る塩基配列を包含し、該塩基配列の調整要素、及び該遺伝子の構造部分を含む。

本発明のDNAは、グルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*) の染色体DNAから次のようにして取得することができる。

まず、グルコンアセトバクター・エンタニイ、例えばアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株 (特許生物寄託センターにFERM BP-491として寄託) の染色体DNAライブラリーを調製する。なお、染色体DNAは特許文献3に開示された方法により取得する。

次に、得られた染色体DNAから酢酸耐性遺伝子を単離するために、染色体DNAライブラリーを作製する。まず、染色体DNAを適当な制限酵素で部分分解して種々のDNA断片混合物を得る。切断反応時間などを調節して切断の程度を調節すれば、幅広い種類の制限酵素が使用できる。例えば、Sau3A Iを温度30℃以上、好ましくは37℃、酵素濃度1~10ユニット/mlで

様々な時間（１分～２時間）、染色体DNAに作用させてこれを消化する。なお、後記実施例ではPst Iを用いた。

次いで、切断された染色体DNA断片を、酢酸菌内で自律複製可能なベクターDNAに連結し、組換えDNAを作製する。具体的には、染色体DNAの切断に用いた制限酵素Pst Iと相補的な末端塩基配列を生じさせる制限酵素、例えばPst Iを温度30℃、酵素濃度1～100ユニット/mlの条件下で、1時間以上ベクターDNAに作用させてこれを完全消化し、切断開裂する。

次いで、上記のようにして得た染色体DNA断片混合物と切断開裂されたベクターDNAを混合し、これにT4 DNAリガーゼを温度4～16℃、酵素濃度1～100ユニット/mlの条件下で1時間以上、好ましくは6～24時間作用させて組換えDNAを得る。

得られた組換えDNAを用いて、通常は寒天培地上で1%よりも高濃度の酢酸の存在下では増殖することのできない酢酸菌、例えばアセトバクター・アセチ1023株（*Acetobacter aceti* No.1023）株（特許生物寄託センターにFERM BP-2287として寄託）を形質転換し、その後2%酢酸含有寒天培地に塗布し、培養する。そこで生じたコロニーを液体培地に接種して培養し、得られる菌体からプラスミドを回収することで酢酸耐性遺伝子を含むDNA断片を得ることができる。

本発明のDNAとして、具体的には、配列表の配列番号1、又は配列番号3の塩基配列を有するDNAが挙げられるが、その内、配列番号1の塩基番号187～1386、もしくは配列番号3の塩基番号110～1321からなる塩基配列はコーディング領域である。

配列番号1に示す塩基配列、又は配列番号2示すアミノ酸配列（図3：塩基番号187～1386に対応）、もしくは配列番号3に示す塩基配列、又は配列番号4に示すアミノ酸配列（図4：塩基番号110～1321に対応）は、DDBJ/EMBL/Genbank及びSWISS-PROT/PIRにおいてホモロジー検索したところ、配列番号1に示す塩基配列1、もしくは配列番号2に示すアミノ酸配列については、アミノ酸配列レベルでスフィンゴモナ

ス・ボーチモビリス (*Sphingomonas paucimobilis*) の S P T 1 遺伝子と 46.3%、マウスの L C B 1 遺伝子、L C B 2 遺伝子とも 26.3%、24.8%の相同性を示し、セリンパルミトイルトランスフェラーゼをコードする遺伝子であることが推定されたが、いずれも 50%以下の低い相同性であり、これらの遺伝子とは異なる新規なものであることが明白であった。

また、配列番号 2 に示す塩基配列、又は配列番号 4 に示すアミノ酸配列については、アミノ酸配列レベルで S P T 1 遺伝子と 46.7%、マウスの L C B 1 遺伝子、L C B 2 遺伝子とも 22.6%、19.8%の相同性を示し、セリンパルミトイルトランスフェラーゼをコードする遺伝子であることが推定されたが、いずれも 50%以下の低い相同性であり、これらの遺伝子とは異なる新規なものであることが明白であった。

なお、上記の S P T 遺伝子などが、酢酸耐性と関係していることは全く知られていない。

さらに、本発明の D N A は、すでに取得されている酢酸菌の酢酸耐性遺伝子 (a a r A、a a r B、a a r C) や酢酸耐性を増強する機能を有する A D H 遺伝子などとも異なる新規な酢酸耐性を増強する機能を有する遺伝子であると同定された。

本発明の D N A は、その塩基配列が明らかとなったので、例えば、鋳型として酢酸菌グルコンアセトバクター・エンタニイのゲノム D N A を用い、該塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプライマーに用いるポリメラーゼ・チェーン・リアクション (P C R 反応) によって、または該塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用いるハイブリダイゼーションによっても得ることができる。

オリゴヌクレオチドの合成は、例えば、市販されている種々の D N A 合成機を用いて定法に従って合成できる。また、P C R 反応は、アプライドバイオシステムズ社 (Applied Biosystems) 製のサーマルサイクラー Gene Amp PCR System 2400 を用い、T a q D N A ポリメラーゼ (宝酒造社製) や K O D - P l u s - (東洋紡績社製) などを使用して、定法に従って行なうことができる。

本発明の酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードするDNAは、コードされるタンパク質の酢酸耐性を増強する機能が損なわれない限り、1又は複数の位置で1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたタンパク質をコードするものであっても良い。

このような酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されるように塩基配列を改変することによっても取得され得る。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている突然変異処理によっても取得することができる。

また、一般的にタンパク質のアミノ酸配列およびそれをコードする塩基配列は、種間、株間、変異体、変種間でわずかに異なることが知られているので、実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、酢酸菌全般、中でもアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の種、株、変異体、変種から得ることが可能である。

具体的には、アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌、又は変異処理したアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌、これらの自然変異株若しくは変種から、例えば配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基配列番号187～1386からなる塩基配列を有するDNAと、又は配列表の配列番号3に記載の塩基配列のうち、塩基配列番号110～1321からなる塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、該タンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。ここでいうストリンジェントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNAどうし、例えば70%以上の相同性を有するDNAどうしがハイブリダイズし、それより相同性が低いDNAどうしがハイブリダイズしない条件、あるいは通常のハイブリダイゼーションの洗浄条件、例えば1×SSC

で0.1% SDSに相当する塩濃度で60℃で洗浄が行われる条件などが挙げられる。

## (2) 本発明の酢酸菌

本発明の酢酸菌はアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属の細菌を指し、酢酸耐性が増強されたアセトバクター属細菌及びグルコンアセトバクター属細菌である。

アセトバクター属細菌として具体的には、アセトバクター・アセチ (*Acetobacter aceti*) が挙げられ、アセトバクター・アセチ No. 1023 (*Acetobacter aceti* No.1023) 株 (特許生物寄託センターにFERM BP-2287として寄託) が例示される。

また、グルコンアセトバクター属細菌としては、グルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*) が挙げられ、現在特許生物寄託センターにFERM BP-491として寄託されているアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株が例示される。

酢酸耐性の増強は、例えば酢酸耐性遺伝子の細胞内のコピー数を増幅すること、又は、該遺伝子の構造遺伝子を含むDNA断片をアセトバクター属細菌中で効率よく機能するプロモーター配列に連結して得られる組換えDNAを用いて、アセトバクター属細菌を形質転換することによって増強することができる。

また、染色体DNA上の該遺伝子のプロモーター配列を、アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の細菌中で効率よく機能する他のプロモーター配列、例えば大腸菌のプラスミドpBR322のアンピシリン耐性遺伝子、プラスミドpACYC177のカナマイシン耐性遺伝子、プラスミドpACYC184のクロラムフェニコール耐性遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子などの各遺伝子のプロモーターなどの酢酸菌以外の微生物由来のプロモーター配列に置き換えることによって、酢酸耐性を増強することができる。

該遺伝子の細胞内コピー数の増幅は、該遺伝子を保持するマルチコピーベクターをアセトバクター属細菌の細胞に導入することによって行なうことができる。

る。すなわち、該遺伝子を保持するプラスミド、トランスポゾン等をアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の細菌の細胞に導入することによって行なうことができる。

マルチコピーベクターとしては、pMV24（例えば、非特許文献3参照）やpTA5001（A）、pTA5001（B）（例えば、特許文献4参照）などが挙げられ、染色体組み込み型ベクターであるpMVL1（例えば、非特許文献4参照）も挙げられる。また、トランスポゾンとしては、MuやIS1452などが挙げられる。

アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌へのDNAの導入は、塩化カルシウム法（例えば、非特許文献5参照）やエレクトロポレーション法（例えば、非特許文献6参照）等によって行なうことができる。

アルコール酸化能を有するアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌において、上記のようにしてその酢酸耐性を増強すると、酢酸の生産量や生産効率を増大させることができる。

### （3）食酢製造法

上記のようにして、酢酸耐性遺伝子のコピー数が増幅されたことにより酢酸耐性が選択的に増強されたアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の細菌であって、アルコール酸化能を有するものをアルコール含有培地で培養し、該培地中に酢酸を生産蓄積せしめることにより、食酢を効率よく製造することができる。

本発明の製造法における酢酸発酵は、従来の酢酸菌の発酵法による食酢の製造法と同様に行なえば良い。酢酸発酵に使用する培地としては、炭素源、窒素源、無機物、エタノールを含有し、必要があれば使用菌株が生育に要求する栄養源を適量含有するものであれば、合成培地でも天然培地でも良い。

炭素源としては、グルコースやシュークロースをはじめとする各種炭水化物、各種有機酸が挙げられる。窒素源としては、ペプトン、発酵菌体分解物などの天然窒素源を用いることができる。

また、培養は、静置培養法、振とう培養法、通気攪拌培養法等の好気的条件

下で行ない、培養温度は通常30℃で行なう。培地のpHは通常2.5～7の範囲であり、2.7～6.5の範囲が好ましく、各種酸、各種塩基、緩衝液等によって調製することもできる。通常1～21日間の培養によって、培地中に高濃度の酢酸が蓄積する。

#### (4) 本発明の実施態様

また、本発明に係るORF又はそれを含有する酢酸耐性遺伝子(配列番号1、又は配列番号3)を大腸菌ベクター(マルチコピーベクター)pUC19に挿入してなる組換えプラスミドpUSPT及びpUSPT2は、即ち、pUSPTは日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6の独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにFERM BP-7932として平成14年(2002年)3月1日に寄託され、そしてpUSPT2は日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6の独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにFERM BP-8304として平成15年(2003年)2月26日に寄託されているので、本発明に係る遺伝子のDNAは容易に入手することができ、当業者であれば本発明の実施は容易である。そして、所望するのであれば、この組換えプラスミドを用いて、本発明に係るORF又はそれを含有する酢酸耐性遺伝子を、酢酸菌で自律複製可能なベクターにのせかえ、これを酢酸菌に導入し、これを培養することにより酢酸含量の高い食酢を容易に製造することができる。

更にまた、上記したようにそしてまた後記する実施例からも明らかなように、酢酸耐性遺伝子源の寄託、PCRの態様、プラスミドベクター、組換えプラスミドの作製、宿主菌の寄託その他が明らかにされており、いずれも入手ないし操作、処理が容易であるので、実施例にしたがって各操作、処理を行えば、目的とする酢酸耐性形質転換体を得ることができ、これを使用することにより高濃度の酢酸を製造することができる。したがって、この点からしても、本発明の実施は容易である。

以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。



## 実施例

(実施例1) グルコンアセトバクター・エンタニイからの酢酸耐性遺伝子のクローニングと塩基配列及びアミノ酸配列の決定

### (1) 染色体DNAライブラリーの作製

グルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*) の1株であるアセトバクター・アルトアセトゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株 (FERM BP-491) を6%酢酸、4%エタノールを添加したYPG培地 (3%グルコース、0.5%酵母エキス、0.2%ポリペプトン) で30℃にて振盪培養を行なった。培養後、培養液を遠心分離 (7, 500×g、10分) し、菌体を得た。得られた菌体より、特許文献3に開示された方法により、染色体DNAを調製した。

上記のようにして得られた染色体DNAを制限酵素Pst I (宝酒造社製) で部分消化し、また大腸菌-酢酸菌シャトルベクターpMV24を制限酵素Pst Iで完全消化して、切断した。これらのDNAを適量ずつ混合し、ライゲーションキット (TaKaRa DNA Ligation Kit Ver.2、宝酒造社製) を用いて連結してグルコンアセトバクター・エンタニイの染色体DNAライブラリーを構築した。

### (2) 酢酸耐性遺伝子のクローニング

上記のようにして得られたグルコンアセトバクター・エンタニイの染色体DNAライブラリーを、通常は寒天培地上で酢酸濃度1%程度までしか増殖出来ないアセトバクター・アセチNo. 1023株 (FERM BP-2287) に形質転換した。

その後、形質転換されたアセトバクター・アセチNo. 1023株を、2%酢酸、100μg/mlのアンピシリンを含むYPG寒天培地で、30℃で4日間培養した。

そこで生じたコロニーを100μg/mlのアンピシリンを含むYPG培地に接種して培養し、得られた菌体からプラスミドを回収したところ、図1に示

した約4 k b pのP s t I断片がクローン化されたプラスミドが回収でき、このプラスミドをp P 1と命名した。さらに2 %酢酸を含有するY P G寒天培地でアセトバクター・アセチN o . 1 0 2 3株を生育可能にするD N A断片は、p P 1にクローン化された約4 k b pのP s t I断片中の約2 k b pのE c o R V - B a l I断片であることが確認できた。

このようにして通常は寒天培地上で酢酸濃度1 %程度までしか増殖出来ないアセトバクター・アセチN o . 1 0 2 3株を2 %酢酸含有寒天培地でも増殖可能にする酢酸耐性遺伝子断片を取得した。

### (3) クローン化されたD N A断片の塩基配列の決定

上記のクローン化されたE c o R V - B a l I断片をp U C 1 9のS m a I切断部位に挿入し、該断片の塩基配列を、サンガーのダイデオキシ・チェーン・ターミネーション法によって決定した結果、配列番号1に記載した塩基配列が決定された。配列決定は両方のD N A鎖の全領域について行ない、切断点は全てオーバーラップする様に行なった。

配列番号1記載の塩基配列中には、塩基番号187から塩基番号1386にかけて、配列番号2に記載したような400個のアミノ酸(図3)をコードするオープンリーディング・フレーム(O R F)の存在が確認された。

(実施例2) グルコンアセトバクター・エンタニイ由来の酢酸耐性遺伝子で形質転換した形質転換株での酢酸耐性の増強

#### (1) アセトバクター・アセチへの形質転換

上記の様にクローン化されたアセトバクター・アルトアセトゲネスM H - 2 4 (Acetobacter altoacetigenes MH-24)株(F E R M B P - 4 9 1)由来の酢酸耐性遺伝子を、K O D - P l u s - (東洋紡績社製)を用いてP C R法によって増幅し、増幅したD N A断片を酢酸菌-大腸菌シャトルベクターp M V 2 4 (例えば、非特許文献3参照)の制限酵素S m a I切断部位に挿入したプラスミドp S P Tを作製した。p S P Tに挿入された増幅断片の概略を図1に示した。

P C R法は次のようにして実施した。すなわち、鋳型として上記酢酸菌由来

のゲノムDNAを用い、プライマーとしてプライマー1（その塩基配列を配列番号5（図7）に示す）及びプライマー2（その塩基配列を配列番号6（図8）に示す）を用い、下記する条件にて、PCR法を実施した。

すなわち、PCR法は94℃15秒、60℃30秒、68℃2分を1サイクルとして、30サイクル行った。

このpSPTをアセトバクター・アセチNo. 1023株にエレクトロポレーション法（例えば、非特許文献6参照）によって形質転換した。形質転換株は100  $\mu$ g/mlのアンピシリン及び2%の酢酸を添加したYPG寒天培地で選択した。

選択培地上で生育したアンピシリン耐性の形質転換株について、定法によりプラスミドを抽出して解析し、酢酸耐性遺伝子を保有するプラスミドを保持していることを確認した。

## （2）形質転換株の酢酸耐性

上記のようにして得られたプラスミドpSPTを有するアンピシリン耐性の形質転換株について、酢酸を添加したYPG培地での生育を、シャトルベクターpMV24のみを導入した元株アセトバクター・アセチNo. 1023株と比較した。

具体的には、エタノール3%とアンピシリン100  $\mu$ g/mlを含有する100mlのYPG培地と、エタノール3%、酢酸3%とアンピシリン100  $\mu$ g/mlを含有する100mlのYPG培地のそれぞれに、pSPTを有する形質転換株とシャトルベクターpMV24を有する元株を接種し、30℃で振とう培養（150rpm）を行ない、形質転換株と元株の酢酸添加培地での生育を660nmにおける吸光度を測定することで比較した。

その結果、図2に示すように、酢酸を含有しない培地では形質転換株及び元株はほぼ同様の増殖が可能であったのに対し、3%酢酸と3%エタノールを添加した培地では、形質転換株は増殖が可能であるのに対して、元株アセトバクター・アセチNo. 1023株は増殖できないことが確認でき、酢酸耐性遺伝子の酢酸耐性増強機能が確認できた。

### (3) 形質転換株の温度耐性

前記(1)で得られたプラスミドpSPTを有するアンピシリン耐性の形質転換株について、培養温度を変化させたYPG培地での生育を、シャトルベクターpMV24のみを導入した元株アセトバクター・アセチNo. 1023株と比較した。

具体的には、2Lのミニジャー(千代田製作所製:TBR-2-1)を用いて、酢酸1%、エタノール4%、アンピシリン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む1LのYPG培地にて、 $30^{\circ}\text{C}$ 、 $400\text{rpm}$ 、 $0.20\text{vvm}$ の通気攪拌培養を行ない、酢酸濃度3%程度まで発酵させた。その後、 $200\text{ml}$ の培養液をミニジャー中に残して培養液を取り出し、新たに酢酸、エタノール、アンピシリン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ を含有するYPG培地を $800\text{ml}$ 添加し、酢酸1%でエタノール4%の濃度に調製して、培養温度は $33^{\circ}\text{C}$ に上げて再び発酵を開始した。

さらに発酵が進行し、培地中の酢酸濃度が3%程度になったところで、再び培養液の取り出しと、培地の再添加を行い、さらに培養温度を $36^{\circ}\text{C}$ に上げて同様に発酵させ、さらに同様にして、培養温度を $1^{\circ}\text{C}$ ずつ上げて酢酸発酵を実施した。

そして、菌体増殖を $660\text{nm}$ における吸光度を測定し、酢酸発酵度合を培養液中の酢酸濃度を測定して、比較した。

その結果、図3に示すように、形質転換株では $40^{\circ}\text{C}$ での酢酸発酵、菌体増殖が可能であったのに対して、元株アセトバクター・アセチNo. 1023では $37^{\circ}\text{C}$ までしか酢酸発酵、菌体増殖は確認されず、SPT遺伝子の温度耐性増強機能が確認できた。

### (実施例3) グルコンアセトバクター・エンタニイ由来の酢酸耐性遺伝子で形質転換した形質転換株の酢酸発酵試験

実施例2で得られたプラスミドpSPTを有するアンピシリン耐性の形質転換株について、シャトルベクターpMV24のみを有する元株アセトバクター・アセチNo. 1023株と酢酸発酵能を比較した。

具体的には、5 Lのミニジャー（三ツワ理化学工業社製；KMJ-5A）を用いて、酢酸1%、エタノール4%、アンピシリン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む2.5 LのYPG培地にて、 $30^{\circ}\text{C}$ 、400 rpm、0.20vvmの通気攪拌培養を行ない、酢酸濃度3%まで発酵させた。その後、700 mlの培養液をミニジャー中に残して培養液を取り出し、残った700 mLに対してアンピシリン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む1.8 LのYPG培地を添加して酢酸3%、エタノール4%の濃度に調製し酢酸発酵を開始させ、途中培地中のエタノール濃度が1%を維持するようにエタノールを添加しつつ通気攪拌培養を継続して、形質転換株と元株の酢酸発酵能を比較した。その結果を表1にまとめた。

表1

	最終到達酢酸濃度 (%)	比増殖速度 ( $\text{OD}_{660}/\text{hr}$ )	生産速度 ( $\%/ \text{hr}$ )	増殖誘導期 (hr)
元株	9.5	0.0151	0.103	62.5
形質転換株	11.1	0.0323	0.136	24.0

表1の結果から、形質転換株の方が、最終到達酢酸濃度、比増殖速度、生産速度、増殖誘導期の何れにおいても、顕著に優れていることが確認できた。

（実施例4）グルコンアセトバクター・エンタニイ由来の酢酸耐性遺伝子で形質転換した形質転換株での酢酸耐性の増強

#### （1）アセトバクター・アルトアセトゲネスへの形質転換

実施例2で得られたプラスミドpSPTをグルコンアセトバクター・エンタニイ（*Gluconacetobacter entanii*）の1株であるアセトバクター・アルトアセトゲネスMH-24（*Acetobacter altoacetigenes* MH-24）株（FERM BP-491）にエレクトロポレーション法（例えば、非特許文献6参照）によって形質転換した。形質転換株は $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン及び4%の酢酸と4%のエタノールを添加した0.55%の寒天を含んだYPG寒天培地で選択した。

選択培地上で生育したアンピシリン耐性の形質転換株について、定法によりプラスミドを抽出して解析し、SPT遺伝子を保有するプラスミドを保持して

いることを確認した。

具体的には、5 Lのミニジャー（三ツワ理化学工業社製；KMJ-5A）を用いて、酢酸4%、エタノール4%、アンピシリン100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む2.5 LのYPG培地にて、30℃、500 rpm、0.20 vvmの通気攪拌培養を行ない、酢酸濃度6.3%まで発酵させた。その後、700 mlの培養液をミニジャー中に残して培養液を取り出し、残った700 mLに対してアンピシリン100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む1.8 LのYPG培地を添加して6%、エタノール4%の濃度に調製し酢酸発酵を開始させ、途中培地中のエタノール濃度が1%を維持するようにエタノールを添加しつつ通気攪拌培養を継続して、形質転換株と元株の酢酸発酵能を比較した。その結果を表2にまとめた。

表 2

	最終到達酢酸濃度 (%)	比増殖速度 (OD660/hr)	生産速度 (%/hr)
元株	14.6	0.501	0.142
形質転換株	16.2	0.756	0.175

表2の結果から、形質転換株の方が、最終到達酢酸濃度、比増殖速度、生産速度、増殖誘導期の何れにおいても、顕著に優れていることが確認できた。

（実施例5）アセトバクター・アセチからの酢酸耐性遺伝子のクローニングと塩基配列及びアミノ酸配列の決定

アセトバクター・アセチNo. 1023 (*Acetobacter aceti* No.1023) 株 (FERM BP-2287) をYPG培地（3%グルコース、0.5%酵母エキス、0.2%ポリペプトン）で30℃にて24時間振とう培養を行なった。培養後、培養液を遠心分離（7,500  $\times g$ 、10分）し、菌体を得た。得られた菌体より、染色体DNA調製法（例えば、特許文献3参照）により、染色体DNAを調製した。

上記で調製したDNAを鋳型にし、inverse PCR法を用いて、クローニングした。具体的には、アセトバクター・アルトアセトゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株で得られたDNA配列（配列表1）

より、他の生物種と比較して保存性の高いと思われた領域よりプライマー 3（その塩基配列を配列番号 7（図 9）に示す）、プライマー 4（その塩基配列を配列番号 8（図 10）に示す）を合成した。次に、アセトバクター・アセチ No. 1023 株の染色体 DNA を鋳型とした PCR 反応を行い、約 750 bp の増幅断片を得た。次に、アセトバクター・アセチ No. 1023 株の染色体 DNA を制限酵素 Pst I で完全切断し、定法に従ってライゲーションを行った。ライゲーション産物を鋳型にし、プライマー 5（その塩基配列を配列番号 9（図 11）に示す）、プライマー 6（その塩基配列を配列番号 10（図 12）を用いて PCR を行ない、約 3 kb の増幅断片を取得した。

これらの断片の塩基配列を、上記プライマーを用いてサンガーのダイデオキシ・チェーン・ターミネーション法によって決定した結果、配列番号 3 に記載した塩基配列が決定された。配列決定は両方の DNA 鎖の全領域について行なった。

（実施例 6）アセトバクター・アセチ由来の酢酸耐性遺伝子で形質転換した形質転換株での酢酸耐性の増強

（1）アセトバクター・アルトアセトゲネスへの形質転換

実施例 5 で得られたプラスミド pSPT2 をグルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*) の 1 株であるアセトバクター・アルトアセトゲネス MH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株 (FERMBP-491) にエレクトロポレーション法（例えば、非特許文献 6 参照）によって形質転換した。形質転換株は 100  $\mu$ g/ml のアンピシリン及び 4% の酢酸と 4% のエタノールを添加した 0.55% の寒天を含んだ YPG 寒天培地で選択した。

選択培地上で生育したアンピシリン耐性の形質転換株について、定法によりプラスミドを抽出して解析し、SPT 遺伝子を保有するプラスミドを保持していることを確認した。

具体的には、5 L のミニジャー（三ツワ理化学工業社製；KMJ-5A）を

用いて、酢酸4%、エタノール4%、アンピシリン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む2.5LのYPG培地にて、 $30^{\circ}\text{C}$ 、500rpm、0.20vvmの通気攪拌培養を行ない、酢酸濃度6.3%まで発酵させた。その後、700mlの培養液をミニジャー中に残して培養液を取り出し、残った700mLに対してアンピシリン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む1.8LのYPG培地を添加して6%、エタノール4%の濃度に調製し酢酸発酵を開始させ、途中培地中のエタノール濃度が1%を維持するようにエタノールを添加しつつ通気攪拌培養を継続して、形質転換株と元株の酢酸発酵能を比較した。その結果を表3にまとめた。

表3

	最終到達酢酸濃度 (%)	比増殖速度 ( $\text{OD}660/\text{hr}$ )	生産速度 ( $\%/ \text{hr}$ )
元株	14.6	0.501	0.142
形質転換株	16.0	0.605	0.153

表3の結果から、形質転換株の方が、最終到達酢酸濃度、比増殖速度、生産速度、増殖誘導期の何れにおいても、顕著に優れていることが確認できた。

#### 発明の効果

本発明により、酢酸耐性に関与する新規な遺伝子が提供され、さらに該遺伝子を用いてより高酢酸濃度の食酢を高効率で製造可能な育種株を取得することができ、更に、該育種株を用いたより高酢酸濃度の食酢を高効率で製造する方法の提供が可能となった。



## 請 求 の 範 囲

1 下記の (A)、又は (B) に示すタンパク質 S P T。

(A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質。

2 下記の (A)、又は (B) に示すタンパク質 S P T をコードする遺伝子の D N A。

(A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質。

3 下記の (a)、又は (b) に示す D N A である請求項 2 に記載の遺伝子の D N A。

(a) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 1 8 7 ~ 1 3 8 6 からなる塩基配列を含む D N A。

(b) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 1 8 7 ~ 1 3 8 6 からなる塩基配列又はその一部を有するプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードする D N A。

4 下記の (A)、又は (B) に示すタンパク質 S P T 2。

(A) 配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質 S P T 2。

5 下記の (A)、又は (B) に示すタンパク質 S P T 2 をコードする遺伝子の D N A。

(A) 配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質 SPT 2。

6 下記の (A)、又は (B) に示す DNA である請求項 5 に記載の遺伝子の DNA。

(A) 配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 386～1636 からなる塩基配列を含む DNA。

(B) 配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 386～1636 からなる塩基配列又はその一部から作製したプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、増殖速度を促進する機能を有するタンパク質をコードする DNA。

7 請求項 2、又は請求項 3、もしくは請求項 5、又は請求項 6 に記載の DNA の細胞内のコピー数が増幅されたことにより、酢酸耐性が増強された微生物。

8 微生物がアセトバクター属、又はグルコンアセトバクター属の酢酸菌であることを特徴とする請求項 7 に記載の微生物。

9 請求項 7、又は請求項 8 に記載の微生物のうち、アルコール酸化能を有するものを、アルコールを含有する培地で培養して該培地中に酢酸を生成蓄積せしめることを特徴とする食酢の製造方法。

10 請求項 2、又は請求項 3 に記載の DNA を含んだ組換えプラスミド pUSPT (FERM BP-7932)、もしくは請求項 5、又は請求項 6 に記載の DNA を含んだ組換えプラスミド pUSPT 2 (FERM BP-8304)。

図面

図 1

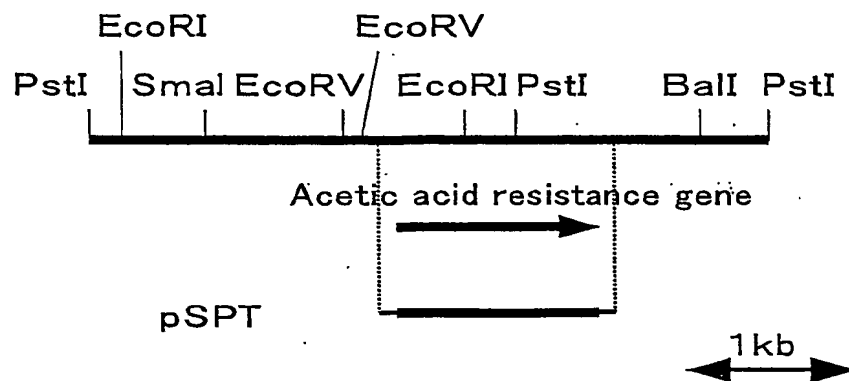


図 2

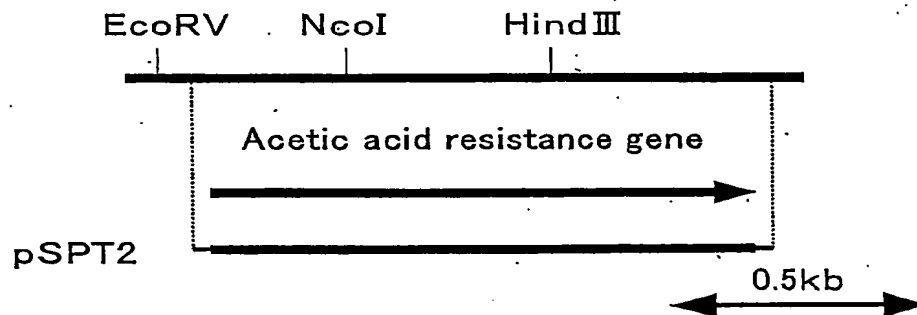


図 3

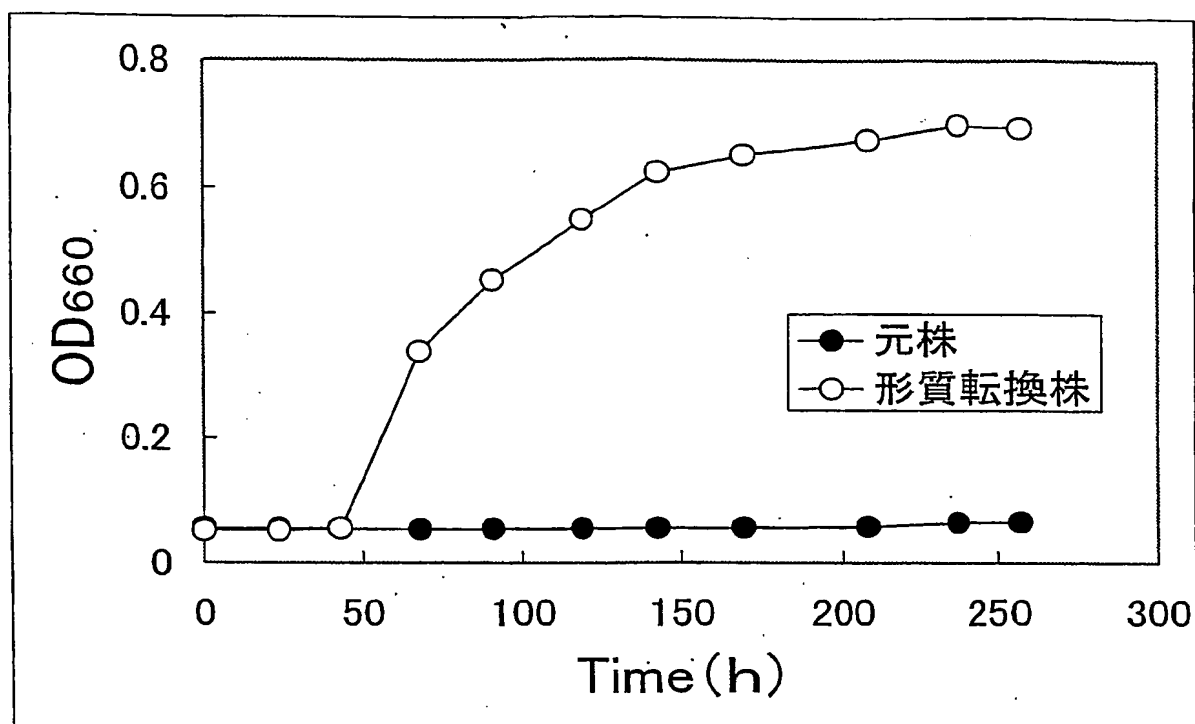
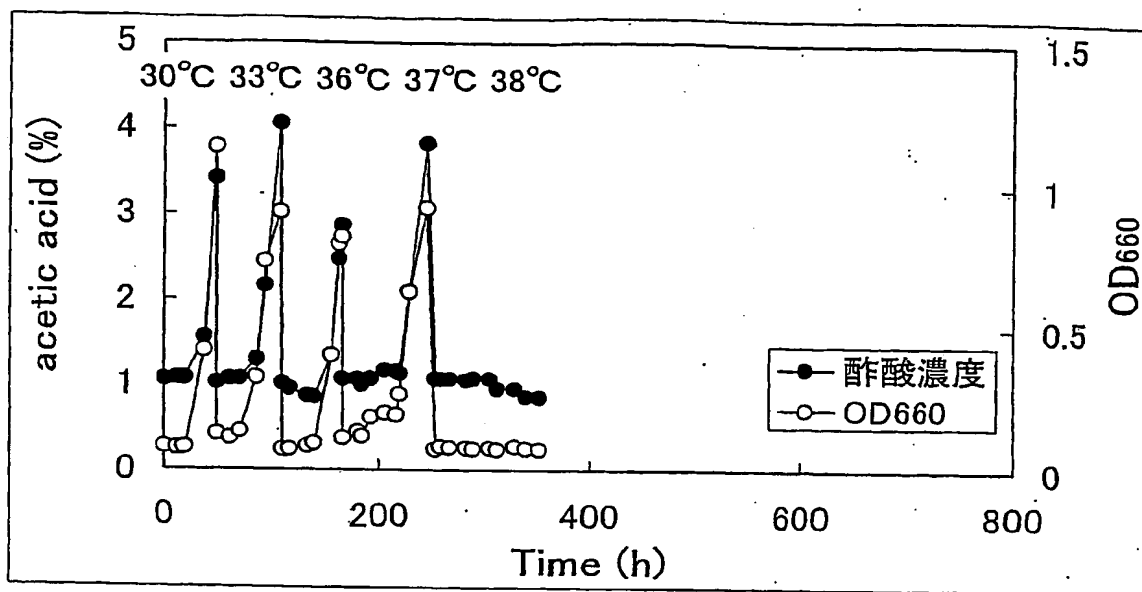
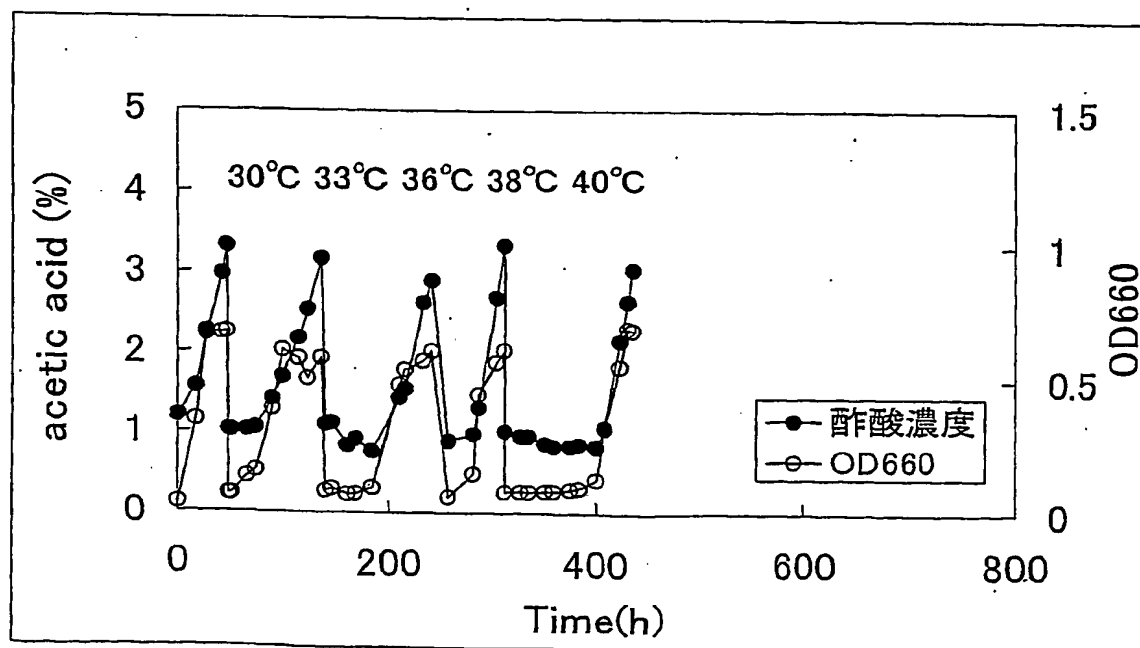


図 4

## 元株の発酵経過



## 形質転換株の発酵経過



5

MetSerIlePheSerLysTyrGluGlyLeu AlaSerAlaLeuSerAlaValThrAlaAsp	20
GlyGlyArgAsnPropheAsnValValIle GluLysProIleSerSerThrValGlyLeu	40
IleGluGlyArgGluThrLeuLeuPheGly ThrAsnAsnTyrLeuGlyLeuSerGlnSer	60
ProAlaAlaIleGluAlaAlaValGluAla AlaArgAlaTyrGlyValGlyThrThrGly	80
SerArgIleAlaAsnGlyThrGlnGlyLeu HisArgGlnLeuGluGluArgLeuCysThr	100
PhePheArgArgArgHisCysMetValPhe SerThrGlyTyrGlnAlaAsnLeuGlyThr	120
IleSerAlaLeuAlaGlyLysAspAspTyr LeuLeuLeuAspAlaAspSerHisAlaSer	140
IleTyrAspGlySerArgLeuGlyHisAla GlnValIleArgPheArgHisAsnAspAla	160
AspAspLeuHisLysArgLeuArgArgLeu AspGlyThrProGlyAlaLysLeuValVal	180
ValGluGlyIleTyrSerMetMetGlyAsp ValValProMetAlaGluPheAlaAlaVal	200
LysArgGluThrGlyAlaTrpLeuLeuAla AspGluAlaHisSerValGlyValMetGly	220
GluHisGlyArgGlyValAlaGluSerAsp GlyValGluAspAspValAspPheValVal	240
GlyThrPheSerLysSerLeuGlyThrVal GlyGlyTyrCysValSerAsnHisAlaGly	260
LeuAspLeuIleArgLeuCysSerArgPro TyrMetPheThrAlaSerLeuProProGlu	280
ValIleAlaAlaThrMetAlaAlaLeuThr GluLeuGluAsnArgProGluLeuArgVal	300
ArgLeuMetAspAsnAlaArgArgLeuHis AspGlyLeuGlnAlaAlaGlyLeuArgThr	320
GlyProGlnAlaSerProValValSerVal IleLeuAspAspValAlaValAlaValAla	340
PheTrpAsnArgLeuLeuAspLeuGlyVal TyrValAsnLeuSerLeuProProAlaThr	360
ProAspGlnHisProLeuLeuArgThrSer ValMetAlaThrHisThrProGluGlnIle	380
AspArgAlaValGluIlePheAlaValVal AlaGlyGluMetGlyIleAsnArgAlaAla	400

## 図 6

MetThrSerLeuPheSerLysPheGluGly ThrAlaGlyAlaLeuGlySerValValAla	20
ValGlyGlyArgAsnProPheAlaValVal IleGluLysProValSerSerThrValGly	40
IleIleGluGlyArgGluThrLeuLeuPhe GlyThrAsnAsnTyrLeuGlyLeuSerGln	60
SerLysAsnAlaIleGlnAlaAlaGlnGln AlaAlaAlaAlaCysGlyValGlyThrThr	80
GlySerArgIleAlaAsnGlyThrGlnSer LeuHisArgGlnLeuGluLysAspIleAla	100
AlaPhePheGlyArgArgAspAlaMetVal PheSerThrGlyTyrGlnAlaAsnLeuGly	120
IleIleSerThrLeuAlaGlyLysAspAsp HisLeuPheLeuAspAlaAspSerHisAla	140
SerIleTyrAspGlySerArgLeuSerAla AlaGluValIleArgPheArgHisAsnAsp	160
ProAspAsnLeuTyrLysArgLeuLysArg MetAspGlyThrProGlyAlaLysLeuIle	180
ValValGluGlyIleTyrSerMetThrGly AsnValAlaProIleAlaGluPheValAla	200
ValLysLysGluThrGlyAlaTyrLeuLeu ValAspGluAlaHisSerPheGlyValLeu	220
GlyGlnAsnGlyArgGlyAlaAlaGluAla AspGlyValGluAlaAspValAspPheVal	240
ValGlyThrPheSerLysSerLeuGlyThr ValGlyGlyTyrCysValSerAspHisPro	260
GluLeuGluPheValArgLeuAsnCysArg ProTyrMetPheThrAlaSerLeuProPro	280
GluValIleAlaAlaThrThrAlaAlaLeu LysAspMetGlnAlaHisProGluLeuArg	300
LysGlnLeuMetAlaAsnAlaGlnGlnLeu HisAlaGlyPheValAspIleGlyLeuAsn	320
AlaSerLysHisAlaThrProValIleAla ValThrLeuGluThrAlaGluGluAlaIle	340
ProMetTrpAsnArgLeuLeuGluLeuGly ValTyrValAsnLeuSerLeuProProAla	360
ThrProAspSerArgProLeuLeuArgCys SerValMetAlaThrHisThrProGluGln	380
IleAlaGlnAlaIleAlaIlePheArgGln AlaAlaAlaGluValGlyValThrIleThr	400
ProSerAlaAla	

## 図 7

5'-CTGGCTGCCTGTATCGTCTCTCTCAAGCAG-3'

## 図 8

5'-ACGGCTGCAGCTGGTCTTGCCGTATCT-3'

[X] 9

5'-GGCAAACCTCGGCATTATTTCCACGCTGGC-3'

[X] 10

5'-GCGAATCTGGTGTAGCCGGAGGAAGGCTG-3'

[X] 11

5'-GCCAGCGTGGAAATAATGCCGAGGTTTGCC-3'

[X] 12

5'-CAGCCTTCCTCCGGCTACACCAGATTGCG-3'



## SEQUENCE LISTING

<110> Mitsukan Group Corporation

<120> Structural gene responsible for acetic acid resistance in acetic acid bacteria, acetic acid bacteria transformed with said gene, and acetic acid fermentation using said transformants.

<130> 6676

<141> 2003-3-12

<160> 4

<210> 1

<211> 2016

<212> DNA

<213> *Gluconacetobacter entanii*

<400> 1

```

gatataaatg gcagcagcaa gatcggtgag gatctggcct ttgattcact ggccgctcatg    60
aattttgtca tggaaatcga ggacacgctc gacgtttccg tgccgcttga ccggttggt    120
gatataccga ccattgatga tctggctgcc tgtatcgtct ctctcaagca ggcatacctga    180
tacaccatgt cgattttctc gaaatatgaa ggccctgcgt ccgccctgtc ggccgtaacg    240
gccgatgggtg ggccgaaccc gtccaacgct gtgatcgaaa agccatttc ctccacggct    300
gggtgatcg aagggcgca gacgcttctg ttccggacca acaactatct tgggtgagc    360
cagtcgcccg ccgcatcga agcggcggtg gaagccgcca gggcttatgg tgcggcacg    420
accgatcgc gcatacga tggcacgcag ggtctgcacc gccagttgga agagcggctg    480
tgcaccttct tccgtcgtcg gcaatgcatg gtgttttcca ccggttacca ggccaatctg    540
ggcacgattt ccgcaatggc gggcaaggac gattatctgc tgcctgatgc ggacagccat    600
gccagcatct atgatggcag ccgcttggtc catgcgcagg tcatacgtt ccgtcacaac    660
gacgccgatg acctgcataa acgctgcgc cgccttgatg gtacgcccg agcgaaactg    720
gtcgtggctg aaggcatcta ttccatgatg ggcgacgtcg ttcccatggc ggaattcgcg    780
gccgtcaagc gggaaaccgg tgcattggtg ctggcggatg aagcacattc cgttggtgta    840

```

```

atgggcgaac atggccgtgg cgtggcggaa tccgacggcg tggaagatga tgtcgatttt 900
gtcgtcgga ccttttccaa aagccttggc acggttggtg gctactgtgt ttccaacccat 960
gccgggctgg acctgatccg gctgtgttcg cgtccgtaca tgttcacccg atccctgccg 1020
ccggaagtca tcgccgcgac catggccgcg ctgactgaac tggaaaaccg gccggaactg 1080
cgcggtcggt tgatggacaa tgcacgcagg cttcatgacg ggctgcagge ggccggcctg 1140
cgcaccggcc cgcaggccag tcctgtcgtg tccgtcattc tggatgatgt ggcggttgcc 1200
gtggcgttct ggaaccgget gctggacctt ggggtttacg tcaacctcag cctgccgcct 1260
gcaacgcccc accagcatcc cctgctgcgg acctccgtca tggcgaccca tacgccggag 1320
cagatagacc gggcggtgga aatcttcgcc gttgtagcgg gcgagatggg tatcaaccgc 1380
gccgcctgaa aaaacctgcc tgccgtaatt tccacagcag atacggcagg cagaccagcg 1440
gatgccgttc cgaaaacggc cccagcggca gttcaatgcc ggaatgccgc ctgatcttcc 1500
atgcgatata gcgcgcgcca ccttcaaacg tgaaggcccc cttgaacagg cggctgacat 1560
tcagcacgcg cccagccga ccacgcagcc accagccttc gtacatcttc cggcgcagtt 1620
caggtgtcag ctgggggggt agttgatcgc cctcagaccg gaacggcagg ccatcggcgc 1680
gccatacatc cggcagcagg cgcctgtacc gtgcttctcg cccctgtagc aggctacgcg 1740
gcctgcggcc gttctccaca cgcagttccg caccgtaagt atgggcgaac agggccagcc 1800
agtagtcate ggccgtgccc tgtgccggac ccagggcggc agccagcgc cccgcctgcc 1860
ccaccgcgcg gataatgcag gccaggatgg catcggcgcg gtccggttcc ctgaccata 1920
caagccgcac aggttggcag aagcgtgccc agaccgtggt atccaacgtg gcgcgtcccg 1980
tcatgcggcg gaactgcgct atggacagga tggcca 2016

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 400

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Gluconacetobacter entanii

&lt;400&gt; 2

Met Ser Ile Phe Ser Lys Tyr Glu Gly Leu Ala Ser Ala Leu Ser Ala

5

10

15

Val Thr Ala Asp Gly Gly Arg Asn Pro Phe Asn Val Val Ile Glu Lys

20	25	30
Pro Ile Ser Ser Thr Val Gly Leu Ile Glu Gly Arg Glu Thr Leu Leu		
35	40	45
Phe Gly Thr Asn Asn Tyr Leu Gly Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ala Ile		
50	55	60
Glu Ala Ala Val Glu Ala Ala Arg Ala Tyr Gly Val Gly Thr Thr Gly		
65	70	75
Ser Arg Ile Ala Asn Gly Thr Gln Gly Leu His Arg Gln Leu Glu Glu		
85	90	95
Arg Leu Cys Thr Phe Phe Arg Arg Arg His Cys Met Val Phe Ser Thr		
100	105	110
Gly Tyr Gln Ala Asn Leu Gly Thr Ile Ser Ala Leu Ala Gly Lys Asp		
115	120	125
Asp Tyr Leu Leu Leu Asp Ala Asp Ser His Ala Ser Ile Tyr Asp Gly		
130	135	140
Ser Arg Leu Gly His Ala Gln Val Ile Arg Phe Arg His Asn Asp Ala		
145	150	155
Asp Asp Leu His Lys Arg Leu Arg Arg Leu Asp Gly Thr Pro Gly Ala		
165	170	175
Lys Leu Val Val Val Glu Gly Ile Tyr Ser Met Met Gly Asp Val Val		
180	185	190
Pro Met Ala Glu Phe Ala Ala Val Lys Arg Glu Thr Gly Ala Trp Leu		
195	200	205
Leu Ala Asp Glu Ala His Ser Val Gly Val Met Gly Glu His Gly Arg		
210	215	220
Gly Val Ala Glu Ser Asp Gly Val Glu Asp Asp Val Asp Phe Val Val		
225	230	235
Gly Thr Phe Ser Lys Ser Leu Gly Thr Val Gly Gly Tyr Cys Val Ser		240

245                      250                      255  
 Asn His Ala Gly Leu Asp Leu Ile Arg Leu Cys Ser Arg Pro Tyr Met  
 260                      265                      270  
 Phe Thr Ala Ser Leu Pro Pro Glu Val Ile Ala Ala Thr Met Ala Ala  
 275                      280                      285  
 Leu Thr Glu Leu Glu Asn Arg Pro Glu Leu Arg Val Arg Leu Met Asp  
 290                      295                      300  
 Asn Ala Arg Arg Leu His Asp Gly Leu Gln Ala Ala Gly Leu Arg Thr  
 305                      310                      315                      320  
 Gly Pro Gln Ala Ser Pro Val Val Ser Val Ile Leu Asp Asp Val Ala  
 325                      330                      335  
 Val Ala Val Ala Phe Trp Asn Arg Leu Leu Asp Leu Gly Val Tyr Val  
 340                      345                      350  
 Asn Leu Ser Leu Pro Pro Ala Thr Pro Asp Gln His Pro Leu Leu Arg  
 355                      360                      365  
 Thr Ser Val Met Ala Thr His Thr Pro Glu Gln Ile Asp Arg Ala Val  
 370                      375                      380  
 Glu Ile Phe Ala Val Val Ala Gly Glu Met Gly Ile Asn Arg Ala Ala  
 385                      390                      395                      400

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1705

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Acetobacter aceti

&lt;400&gt; 3

gaagacagct tggatgtatc tatcccgctc gacaaactgg ctgatatccg aacgattaat 60  
 gaccttgccg cttgcattgt tgctctgaaa aacaaagggt gaggcgtgga tgacatcact 120  
 attttccaaa tttgaaggta cggcaggcgc gctgggttcc gttgtggccg taggcggctc 180  
 caaccctttt gctgttgta ttgaaaaacc tgtctcttca actgttgga ttattgaagg 240

tcgggaaacg cttctttttg gcaccaataa ctatttgggg cttagtcaat ccaaaaatgc 300  
 cattcaagca gcccagcagg ctgccgcggc atgtggcgta ggcacaacgg gctcacgcat 360  
 tgcaaatggc acacaatccc tgcaccgaca gcttgaaaaa gatattgccg cgttttttgg 420  
 tcggcgtgat gccatggttt ttccacggg gtatcaggca aacctcggca ttatttccac 480  
 gctggcaggt aaggatgacc acctgtttct ggatgctgat agccacgcca gtatctatga 540  
 tggcagccgc ctgagtgcag cagaagttat tcgcttcgcg cataatgac cagacaacct 600  
 ttataaacgc cttaaacgca tggatggcac gccaggcgcc aaattgattg tggttgaagg 660  
 catttatcc atgacgggta atgttgcccc gattgcagaa tttgttgctg ttaaaaaaga 720  
 aacaggcgt tacctgctgg tagatgaagc ccattctttt ggcggtgttg gtcaaatgg 780  
 gcgtggtgcc gctgaggctg atggcggtga agctgatgtg gactttgttg tcggcacatt 840  
 ttccaaaagc ttgggcacag ttggcggtta ctgcgtatct gaccatcctg agctggagtt 900  
 tgtgcgctta aactgccggc cctatatgtt tacggcatcg ctaccgccgg aagttattgc 960  
 tgccacaacg gctgccttga aagatatgca ggcacatcct gaattgcgta agcagcttat 1020  
 ggcaaacgcg cagcaactac atgcaggttt tgtagatatt gggctaaatg ccagcaaaca 1080  
 cgcaacccca gttattgccg ttacattgga aacagctgaa gaagctattc ccatgtggaa 1140  
 caggtttttg gaacttggtg tttatgtaaa tctcagcctt cctccggeta caccagattc 1200  
 gcggcggttg ctccgttggt ccgtaatggc caccatacgc cccgaacaaa ttgcgcaggc 1260  
 tattgccata ttcaggcagg ctgcggcaga agtaggcgta accatcacac cctccgctgc 1320  
 ttaaaaaaaaa gctatttgcg cttgaatgcc ccttgctgcc 1360

<210> 4

<211> 417

<212> PRT

<213> Acetobacter aceti

<400> 4

Met Thr Ser Leu Phe Ser Lys Phe Glu Gly Thr Ala Gly Ala Leu Gly

5

10

15

Ser Val Val Ala Val Gly Gly Arg Asn Pro Phe Ala Val Val Ile Glu

20

25

30

Lys Pro Val Ser Ser Thr Val Gly Ile Ile Glu Gly Arg Glu Thr Leu

35	40	45
Leu Phe Gly Thr Asn Asn Tyr Leu Gly Leu Ser Gln Ser Lys Asn Ala		
50	55	60
Ile Gln Ala Ala Gln Gln Ala Ala Ala Cys Gly Val Gly Thr Thr		
65	70	75
Gly Ser Arg Ile Ala Asn Gly Thr Gln Ser Leu His Arg Gln Leu Glu		
85	90	95
Lys Asp Ile Ala Ala Phe Phe Gly Arg Arg Asp Ala Met Val Phe Ser		
100	105	110
Thr Gly Tyr Gln Ala Asn Leu Gly Ile Ile Ser Thr Leu Ala Gly Lys		
115	120	125
Asp Asp His Leu Phe Leu Asp Ala Asp Ser His Ala Ser Ile Tyr Asp		
130	135	140
Gly Ser Arg Leu Ser Ala Ala Glu Val Ile Arg Phe Arg His Asn Asp		
145	150	155
Pro Asp Asn Leu Tyr Lys Arg Leu Lys Arg Met Asp Gly Thr Pro Gly		
165	170	175
Ala Lys Leu Ile Val Val Glu Gly Ile Tyr Ser Met Thr Gly Asn Val		
180	185	190
Ala Pro Ile Ala Glu Phe Val Ala Val Lys Lys Glu Thr Gly Ala Tyr		
195	200	205
Leu Leu Val Asp Glu Ala His Ser Phe Gly Val Leu Gly Gln Asn Gly		
210	215	220
Arg Gly Ala Ala Glu Ala Asp Gly Val Glu Ala Asp Val Asp Phe Val		
225	230	235
Val Gly Thr Phe Ser Lys Ser Leu Gly Thr Val Gly Gly Tyr Cys Val		
245	250	255
Ser Asp His Pro Glu Leu Glu Phe Val Arg Leu Asn Cys Arg Pro Tyr		
260	265	270

Met Phe Thr Ala Ser Leu Pro Pro Glu Val Ile Ala Ala Thr Thr Ala  
 275 280 285  
 Ala Leu Lys Asp Met Gln Ala His Pro Glu Leu Arg Lys Gln Leu Met  
 290 295 300  
 Ala Asn Ala Gln Gln Leu His Ala Gly Phe Val Asp Ile Gly Leu Asn  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Lys His Ala Thr Pro Val Ile Ala Val Thr Leu Glu Thr Ala  
 325 330 335  
 Glu Glu Ala Ile Pro Met Trp Asn Arg Leu Leu Glu Leu Gly Val Tyr  
 340 345 350  
 Val Asn Leu Ser Leu Pro Pro Ala Thr Pro Asp Ser Arg Pro Leu Leu  
 355 360 365  
 Arg Cys Ser Val Met Ala Thr His Thr Pro Glu Gln Ile Ala Gln Ala  
 370 375 380  
 Ile Ala Ile Phe Arg Gln Ala Ala Ala Glu Val Gly Val Thr Ile Thr  
 385 390 395 400  
 Pro Ser Ala Ala

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

ctggctgcct gtatcgtctc tctcaagcag 30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

acggctgcag ctggtctgcc tgccgtatct 30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

ggcaaacctc ggcattatct ccacgtggc 30

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

gcgaatctgg tgtagccgga ggaaggctg 29

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

gccagcgtgg aaataatgcc gaggtttgcc 30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

cagccttcct ccggtacac cagattcgc 29



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02946

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/54, C12N9/10, C12N1/21, C12J1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/54, C12N9/10, C12N1/21, C12J1/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPLUS FILE (JOIS),  
SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 332120 A (Nakano Vinegar Co., Ltd.), 13 September, 1989 (13.09.89), & US 5914257 A & JP 2-002364 A	1-10
A	US 4654306 A (Nakano Vinegar Co., Ltd.), 31 March, 1987 (31.03.87), & JP 60-180581 A	1-10
A	JP 60-9489 A (Teruhiko BEPPU), 18 January, 1985 (18.01.85), (Family: none)	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
22 April, 2003 (22.04.03)

Date of mailing of the international search report  
13 May, 2003 (13.05.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>1</sup> C12N15/54, C12N9/10, C12N1/21, C12J1/04		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>1</sup> C12N15/54, C12N9/10, C12N1/21, C12J1/04		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), JSTPLUSファイル(JOIS) SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 332120 A (中埜酢店) 1989.09.13 & US 5914257 A & JP 2-002364 A	1-10
A	US 4654306 A (中埜酢店) 1987.03.31 & JP 60-180581 A	1-10
A	JP 60-9489 A (別府輝彦) 1985.01.18 (ファミリーなし)	1-10
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 22.04.03	国際調査報告の発送日 13.05.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 恵理子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4B 3037 (印)